



## 肌酸含量检测试剂盒(微量法)

中文名称：**肌酸含量检测试剂盒**

英文名称：Creatine Content Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：100T/48S

储存条件：2-8°C

检测方法：微量法

有效期：6个月

产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二	液体 10mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	粉剂×1 支	2-8°C保存
试剂一稀释液	液体 5 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 2 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

溶液的配制：

1. 试剂一：临用前加入 0.33mL 乙醇溶解，-20°C可以保存 2 周，试剂若变为深棕色则不可再使用；
2. 试剂一工作液：临用前根据样本量按试剂一：试剂一稀释液=40 $\mu$ L：560 $\mu$ L（共 600 $\mu$ L，约 15T）的比例进行配制，现配现用，当天用完；
3. 标准品：1mg 一水肌酸。临用前加入 1mL 蒸馏水，充分溶解，即 1mg/mL 一水肌酸标



准储备液。用不完的试剂 4°C保存一个月。

### 产品说明：

肌酸(Creatine)是一种含氮化合物，自然存在于脊椎动物体内，能够辅助为肌肉和神经细胞提供能量。肌酸可由精氨酸(arginine)、甘氨酸(glycine)及甲硫氨酸(methionine)三种氨基酸合成，可由人体自行合成，也可以从食物中摄取。大约 95%的肌酸存在于骨骼肌中，主要存在形式为磷酸肌酸。肌酸作为一种补充剂主要通过增加肌肉质量，增强运动表现能力。肌酸也被作为神经肌肉疾病的一种治疗药被广泛研究，它可能有助于保护神经和改善细胞生物功能状态。

肌酸可在碱性条件下与联乙酰- $\alpha$ -萘酚发生反应，生成红色产物在 530nm 处有吸收峰。

**注意：**实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理(可适当调整待测样本量)

1. 组织：按照质量(g)：提取液一体积(mL)为 1：5~10 的比例(建议称取约 0.1g，加入 1mL 提取液一)加入提取液一，冰浴匀浆后于 4°C,12000g 离心 10min，取 0.8mL 上清液，再缓慢加入 0.15mL 提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4°C12000g 离心 10min 后取上清待测。

2. 细胞：按照细胞数量( $10^6$ 个)：提取液一体积(mL)为 5~10：1 的比例(建议  $5 \times 10^6$  个细胞加入 1mL 提取液一)，冰浴超声波破碎细胞(功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间



3min); 于 4°C,12000g 离心 10min, 取 0.8mL 上清液, 再缓慢加入 0.15mL 提取液二, 缓慢吹打混匀至无气泡产生, 4°C12000g 离心 10min 后取上清待测。血清(浆)等液体: 取 100μL 液体加入 1mL 提取液一, 4°C12000g 离心 10min, 取 0.8mL 上清液, 再缓慢加入 0.15mL 提取液二, 缓慢吹打混匀至无气泡产生, 12000g 离心 10min 后取上清待测。

**注:** 提取液二需缓慢加入, 加入后会产生大量气泡, 建议使用 2mLEP 管进行操作。

## 二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 530nm, 蒸馏水调零。
- 2、标准溶液配制: 将 1mg/mL 一水肌酸标准储备液, 用蒸馏水稀释至 200、160、130、100、50、25、12.5μg/mL 标准溶液待用。
- 3、按下表步骤加样:

试剂名称(μL)	测定管	对照管	空白管	标准管
样本	20	20	-	-
蒸馏水	-	20	20	-
标准溶液	-	-	-	20
试剂一工作液	40	40	40	40
试剂二	20	-	20	20
室温避光反应 10min				
蒸馏水	120	120	120	120
充分混匀, 于 530nm 处测定吸光度。分别记为 A 测定、A 对照、A 空白、A 标准。 $\Delta A$ 测定=A 测定-A 对照, $\Delta A$ 标准=A 标准-A 空白。空白管和标准曲线只需进行 1-2 次。				

**注:** 空白管只需做 1-2 次。

## 三、肌酸含量计算

### 1、标准曲线绘制:

以肌酸标准溶液浓度为横坐标(x, μg/mL), 以 $\Delta A$  标准为纵坐标(y)绘制标准曲线, 得到线性回归方程  $y=kx+b$ , 将 $\Delta A$  测定带入方程求得 x(μg/mL)。



## 2、计算公式

### (1) 按照蛋白浓度计算

$$\text{肌酸含量}(\mu\text{g}/\text{mgprot}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \times 0.879 = x \div \text{Cpr} \times 0.879$$

### (2) 按照样本质量计算

$$\text{肌酸含量}(\mu\text{g}/\text{g 质量}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \times 0.879 = 1.044 \times x \div W$$

### (3) 按照细菌或细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{肌酸含量}(\mu\text{g}/10^4\text{cell}) &= x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \times 0.879 \\ &= 1.044 \times x \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

### (4) 按照血清(浆)体积计算

$$\text{肌酸含量}(\mu\text{g}/\text{mL}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{提取液一}} + V_{\text{液体}})] \times 0.879 = 11.482 \times x$$

V 样：加入样本体积，20 $\mu$ L=0.02mL；V 上清：提取液一提取时上清液体积，0.8mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细胞或细菌数量，以 10<sup>4</sup>计；V 提取液一：加入提取液一体积，1mL；V 提取液二：加入提取液二体积，0.15mL；V 液体：液体样本体积，0.1mL；0.879：换算系数，一水肌酸相对分子质量 149.15，无水肌酸相对分子质量 131.13，0.879=131.13 $\div$ 149.15。

### 注意事项：

- 1、显色完成后，请在 10min 之内完成检测。
- 2、提取液中含有蛋白沉淀剂，提取的上清液不能用于蛋白浓度的测定。若想要用蛋白浓度计算肌酸含量需要另取样本，即取相同质量的组织、同等数目的细菌或细胞，用 1.1875mLPBS(生理盐水)匀浆；取相同体积的血清(浆)，用 1.206mLPBS(生理盐水)匀浆(相



当于提取步骤最终样本上清液)，用 BCA 法进行蛋白浓度测定。

3、如果测定吸光值低于或超过标准溶液线性范围的吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。

4、试剂一、试剂二对人体有刺激性，请采取适当的防护措施。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴乳胶手套操作。

#### 实验实例：

1、取 0.1g 兔肾脏加入 1mL 提取液一进行匀浆研磨离心，取 0.8mL 上清后加 0.15mL 提取液二，离心取上清后按照测定步骤操作，用 96 孔板测定后计算  $\Delta A$  测定 = A 测定 - A 对照 = 0.128 - 0.064 = 0.064，带入标准曲线  $y = 0.0062x - 0.0143$ ，计算  $x = 12.629$ 。按样本质量计算含量得：肌酸含量( $\mu\text{g/g}$  质量) =  $1.044 \times x \div W = 131.85 \mu\text{g/g}$  质量。

2、取 100 $\mu\text{L}$  牛血清加入 1mL 提取液一，离心取 0.8mL 上清后加 0.15mL 提取液二，离心取上清，之后按照测定步骤操作，用 96 孔板测定后计算  $\Delta A$  测定 = A 测定 - A 对照 = 0.271 - 0.07 = 0.201，带入标准曲线  $y = 0.0062x - 0.0143$ ，计算  $x = 34.726$ 。按照液体体积计算含量得：肌酸含量( $\mu\text{g/mL}$ ) =  $11.482 \times x = 398.7 \mu\text{g/mL}$ 。